

VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR DEHIDROLOVASTATIN DALAM PLASMA IN VITRO DENGAN KCKT

Gogok Hariyanto*, L. Broto Sugeng Kardono**, Umar Mansyur***

*Lembaga biomedis Ditkesad, Cibubur

**Pusat Penelitian Kimia LIPI, Serpong

***Departemen Farmasi Fakultas FMIPA UI, Depok

ABSTRACT

Statins are antihyperlipidemic drugs for lowering LDL-cholesterol level in human blood. They were designed to inhibit HMG CoA reductase in the liver so that the enzyme will not catalyze the transformation of HMG CoA into early precursor of LDL-cholesterol. Dehydrolovastatin is a kind of statins whose structure is analogous to lovastatin (its starting material). The aim of this study was to validate method for in vitro analysis of dehydrolovastatin in plasm. The validation included studies of calibration curve and linearity, LLOQ and selectivity, accuracy, precision, recovery, and stability. Dehydrolovastatin was deteminated by Knauer® HPLC using UV 2500 detector, Kromasil® 100-5, C₁₈, 250 mm, 4.6 mm i.d., column. Reversed phase was applied with the optimal condition such as mobile phase acetonitrile and phosphoric acid 0.1 % (75:25), the flow rate of 1.2 mL. minutes⁻¹, simvastatin as internal standard and wavelength 238 nm. Concentrations of sample ranged from 0.013 to 0.200 ppm with correlation coefficient of the calibration curves 0,998 and lower limit of quantitation was 0.013 ppm. The results of validation studies fulfilled standard criteria.

Keywords : dehydrolovastatin level in plasm, validation, in vitro analysis, high performance liquid chromatography

ABSTRAK

Statin adalah kelompok obat antihiperlipidemik yang dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah. Statin dapat menghambat kerja enzim HMG CoA reductase yang berperan dalam reaksi konversi HMG CoA dalam sintesis kolesterol dalam hati. Dehidrolovastatin adalah senyawa analog dari lovastatin yang nantinya digunakan untuk terapi pasien yang mempunyai kadar kolesterol darah yang tinggi. Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan metode yang valid untuk penetapan kadar dehidrolovastatin dalam plasma in vitro. Validasi metode analisis ini meliputi studi tentang kurva kalibrasi dan linieritas, LLOQ dan selektivitas, akurasi, presisi, perolehan kembali dan stabilitas. Metode analisis ini menggunakan KCKT Knauer

Corresponding author : E-mail : gogok_hariyanto@yahoo.com

dengan perangkat detektor UV 2500, kolom Kromasil[®] 100-5, C₁₈, 250 x 4,6 mm. Sistem fase terbalik ini mempunyai kondisi optimum yaitu menggunakan fase gerak asetonitril dan asam fosfat 0,1 % (75:25), laju alir 1,2 mL/menit, standar internal simvastatin dan panjang gelombang 238 nm. Sampel dengan rentang konsentrasi 0,013 - 0,200 ppm memberikan kurva kalibrasi dengan koefisien korelasi 0,998 dan LLOQ 0,013 ppm. Hasil penelitian validasi metode penetapan kadar ini memenuhi persyaratan standar.

Kata kunci : dehidrolovastatin dalam plasma, validasi, metode analisis in vitro, kromatografi cair kinerja tinggi.

PENDAHULUAN

Saat ini telah dikenal beberapa obat hiperkolesterolemia golongan statin dengan struktur yang menyerupai lovastatin. Penelitian terus dikembangkan untuk mendapatkan senyawa analog baru dengan efek terapi yang optimal, sebagai pilihan pengobatan sesuai dengan kondisi pasien dan memperkecil efek samping yang tidak diinginkan. Salah satu hasil penelitian tentang pengembangan derivat lovastatin adalah sintesis dehidrolovastatin (1).

Dehidrolovastatin merupakan prodrug. Aktivitasnya sebagai antilipidemik berhubungan dengan gugus farmakofoor 2-Metil butirat dan struktur laktonnya. Dari hasil uji aktivitas, diketahui bahwa dehidrolovastatin dapat menurunkan kolesterol LDL secara signifikan, setingkat simvastatin. Dehidrolovastatin juga menurunkan kadar trigliserida dan meningkatkan kadar kolesterol HDL lebih besar dibandingkan simvastatin (1).

Salah satu parameter obat yang baik adalah ketersediaan obat aktif

dalam tubuh dalam jumlah yang cukup. Penelitian mengenai validasi metode penetapan kadar obat dalam plasma, merupakan studi awal yang berperan penting dalam hal evaluasi dan interpretasi bioavailabilitas-bioekivalensi untuk dehidrolovastatin. Validasi metode ini meliputi kurva kalibrasi dan linearitas, LLOQ dan selektivitas, akurasi, presisi dan perolehan kembali serta beberapa uji stabilitas (2).

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh metode yang valid untuk penetapan kadar dehidrolovastatin dalam plasma secara kromatografi cair kinerja tinggi.

METODE PENELITIAN

Alat

KCKT Knauer[®] dengan detektor UV 2500, kolom Kromasil[®] 100-5, C₁₈, 250 x 4,6 mm. Spektrofotometer UV-Vis Hitachi U-2000

Bahan

Dehidrolovastatin Puslitkim LIPI, Lovastatin pa Lupin Limited, Simvastatin pa EZI Limited, plasma

darah PMI, asetonitril E.Merck, asam fosfat 85 % E. Merck, metanol E. Merck, aquabidest.

Cara kerja

1. Metode analisis dehidrolovastatin dalam plasma (3, 4)

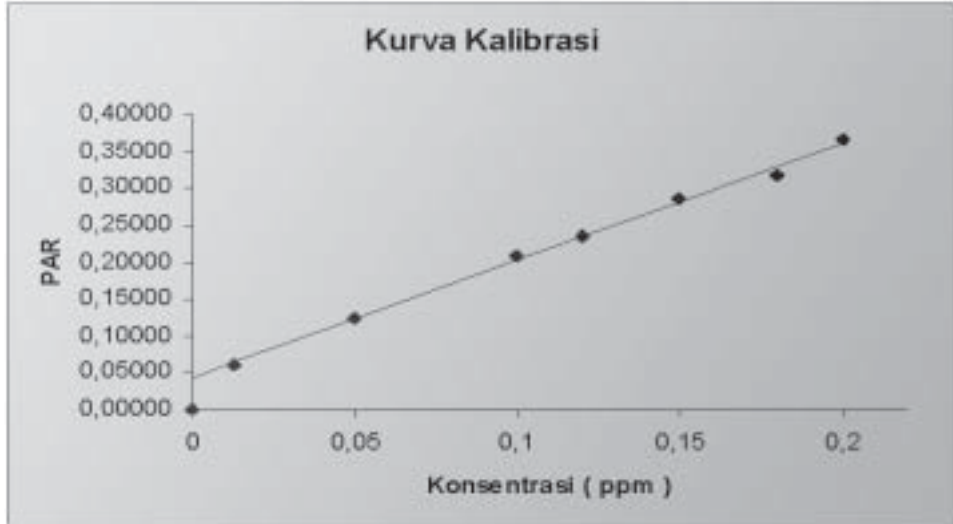
Plasma 0,5 mL ditambah 0,5 mL asetonitril, disentrifus 10900 rpm selama 30 menit. Supernatannya, ditambah 600 ng simvastatin, disentrifus 3400 rpm selama 5 menit. Supernatannya ditambah 1,5 mL etil asetat dan aseton (2:1), divorteks selama 15 detik. Fase organik 1,5 mL dipindahkan ke tabung, diuapkan pada suhu 40 °C dengan aliran gas nitrogen. Residu ditambah dengan 150 µL asetonitril dan air (2:1). Sampel 20 µL diinjeksikan ke kolom KCKT dengan fase gerak asetonitril dan

asam fosfat 0,1% (75:25), laju alir 1,2 mL/menit dan panjang gelombang 238 nm.

2. Validasi metode analisis dehidrolovastatin (2, 5)

a. LOQ dan LLOQ

Plasma 0,5 mL mengandung dehidrolovastatin dengan konsentrasi 0,05; 0,1; 0,12; 0,15; 0,18 dan 0,2 ppm, diekstraksi sesuai prosedur dan dianalisis dengan KCKT. Dibuat kurva kalibrasi, ditentukan persamaan garis regresi dan linieritasnya. Dihitung nilai LOD dan LOQ. LLOQ dibuat dengan cara mengencerkan setengah dan seperempat konsentrasi LOQ, kemudian diekstraksi dengan prosedur yang sama dan pengujian KCKT sebanyak lima kali.



Gambar 1. Kurva kalibrasi sampel plasma dehidrolovastatin dengan rentang konsentrasi 0,013 - 0,200 ppm dan standar internal simvastatin 600 ng menggunakan fase gerak asetonitril dan asam fosfat 0,1 % (75:25), laju alir 1,2 mL/menit dan panjang gelombang 238 nm

b. Kurva kalibrasi dan linieritas

Plasma 0,5 mL mengandung 6 konsentrasi dehidrolovastatin antara 0,013 - 0,200 ppm, diekstraksi sesuai prosedur dan dianalisis dengan KCKT. Selain itu, diujikan juga sampel blangko dan sampel zero. Dibuat kurva kalibrasi, ditentukan persamaan garis regresi, Koefisien korelasinya (r) dan tiga konsentrasi dehidrolovastatin untuk sampel kontrol kualitas.

c. Selektivitas

Plasma 0,5 mL mengandung dehidrolovastatin 0,013 ppm, diekstraksi sesuai prosedur dan dianalisis dengan KCKT, sebanyak lima kali. Pengujian ini dilakukan pada enam plasma yang berbeda sumbernya. Dihitung % diff dan koefisien variasi.

d. Akurasi, presisi dan perolehan kembali

Sampel plasma mengandung dehidrolovastatin konsentrasi rendah 0,05 ppm, sedang 0,12 ppm dan tinggi 0,18 ppm disimpan di *frezeer*, sebelum diujikan pada hari ke-1, ke-2, ke-3 dan ke-6. Plasma 0,5 mL dari ketiga konsentrasi, diekstraksi sesuai prosedur dan dianalisis dengan KCKT, sebanyak lima kali. Dihitung % diff dan koefisien variasi.

e. Stabilitas larutan standar

Sampel dehidrolovastatin 10 ppm dan simvastatin 200 ppm dalam

fase gerak, disimpan di lemari pendingin, sebelum dianalisis dengan KCKT pada hari ke-1, ke-8, ke-15 dan ke-30. Dilihat perubahan kromatogram dan dihitung % diff.

f. Stabilitas beku cair

Sampel plasma mengandung dehidrolovastatin konsentrasi 0,05 ; 0,12 dan 0,18 ppm disimpan di *frezeer* selama 24 jam. sampel dicairkan pada suhu kamar dan disimpan kembali (satu siklus), dilakukan berulang sebanyak tiga kali siklus. Kemudian diekstraksi sesuai prosedur dan dianalisis dengan KCKT. Dilihat perubahan kromatogram dan dihitung % diff.

g. Stabilitas jangka pendek pada suhu kamar

Sampel plasma mengandung dehidrolovastatin konsentrasi 0,05 ; 0,12 dan 0,18 ppm disimpan pada suhu kamar selama 24 jam. Kemudian diekstraksi sesuai prosedur dan dianalisis dengan KCKT. Dilihat perubahan kromatogram dan dihitung % diff.

h. Stabilitas jangka panjang

Sampel plasma mengandung dehidrolovastatin konsentrasi 0,05 ; 0,12 dan 0,18 ppm disimpan di *frezeer* selama 10 ; 20 ; 30 dan 60 hari. kemudian diekstraksi sesuai prosedur dan dianalisis dengan KCKT. Dilihat perubahan kromatogram dan dihitung % diff.

Tabel 1. Kurva kalibrasi sampel dehidrolovastatin dengan konsentrasi 0,013 - 0,200 ppm dan standar internal simvastatin 600 ng

No.	X Kons. sampel (ppm)	Area ($\mu\text{v/s}$)		Y PAR	Rata- rata	X Kons. Terukur (ppm)	Y
		DHL	standar internal				
1	Zero	0	137003	0,00000	0,00000	0,00000	0,04400
		0	135799	0,00000			
2	LLOQ 0,013	8439	139569	0,06046	0,06026	0,01025	0,06463
		7777	129479	0,06006			
3	0,05	16784	135142	0,12419	0,12309	0,04984	0,12335
		15837	129835	0,12199			
4	0,10	28965	138066	0,20979	0,20969	0,10440	0,20270
		28979	138257	0,20960			
5	0,12	30443	130026	0,23413	0,23512	0,12043	0,23444
		30607	129636	0,23610			
6	0,15	38248	133148	0,28726	0,28526	0,15202	0,28205
		38267	135090	0,28327			
7	0,18	41618	130806	0,31817	0,31637	0,17163	0,32966
		42541	135235	0,31458			
8	0,20	49796	135851	0,36655	0,36580	0,20277	0,36140
		47875	131145	0,36505			

HASIL DAN PEMBAHASAN LOQ dan LLOQ

Pengukuran sebanyak 6 sampel plasma dehidrolovastatin dengan rentang konsentrasi 0,050–0,200 ppm dan baku dalam simvastatin 600 ng memberikan hasil persamaan regresi $Y = 0,049 + 1,554 X$ dengan linieritas koefisien korelasi 0,997. Dari hasil pengolahan data diperoleh LOQ 0,04979 dan LLOQ sebesar 0,025 dan 0,0125. Hasil pengujian untuk sampel LLOQ 0,013 ppm menunjukkan nilai % *diff* yaitu -10,43 sampai dengan 7,51 % dan nilai koefisien variasi 8,27 %.

Hal ini memenuhi syarat akurasi (nilai % *diff* sekitar + 20 %) dan syarat presisi (nilai koefisien variasi < 20 %).

Kurva kalibrasi dan linieritas

Pengukuran sampel dehidrolovastatin dengan konsentrasi 0,013 - 0,200 ppm (termasuk sampel zero), memberikan kurva kalibrasi dengan persamaan regresi $Y = 0,044 + 1,587X$ dengan koefisien korelasi 0,998.

Selektivitas

Hasil uji selektivitas menunjukkan koefisien variasi 1,44 % dan

Tabel 2. Uji akurasi, presisi dan perolehan kembali terhadap sampel dehidrolovastatin konsentrasi rendah, sedang dan tinggi

Kons. dehidrolovastatin (ppm)	Waktu sampling hari ke-	PAR Rata-rata	Kons. terukur (ppm)	CV (%)	% Diff	% UPK
Kons. rendah 0,05	1	0,13440	0,05691	1,83	11,19%15,00	102,18
	2	0,12622	0,05181	0,35	3,09%4,04	
	3	0,12407	0,05045	0,98	0,14%2,57	
	6	0,11562	0,04513	3,70	-13,35% -4,30	
Kons. sedang 0,12	1	0,24331	0,12559	0,40	4,01%5,02	101,28
	2	0,24581	0,12716	1,29	3,95%7,78	
	3	0,23503	0,12037	1,85	-1,71% 2,36	
	6	0,22399	0,11341	1,49	-7,24% -3,36	
Kons. tinggi 0,18	1	0,35409	0,19585	2,51	4,90%12,39	103,60
	2	0,32988	0,18014	2,45	-2,74%2,65	
	3	0,32204	0,17520	1,38	-4,50% -1,55	
	6	0,31027	0,16773	0,36	-7,22% -6,50	

memenuhi syarat % *diff* yaitu -11,83 sampai dengan 7,51 %. Sedangkan pada kromatogram tidak terdapat gangguan dari komponen endogen plasma pada sekitar waktu retensi dehidrolovastatin dan standar internal. Ini menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan cukup selektif untuk analisis dehidrolovastatin.

Akurasi

Uji akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya, ditentukan dari nilai perbedaan konsentrasi yang terukur dengan konsentrasi yang sebenarnya (% *diff*). Persyaratan adalah

nilai % *diff* + 20 % untuk sampel konsentrasi rendah dan % *diff* + 15 % untuk sampel konsentrasi sedang dan tinggi. Pada hasil uji akurasi intra hari, nilai % *diff* untuk konsentrasi rendah yaitu 11,19 sampai dengan 15,94 %, untuk konsentrasi sedang yaitu 4,01 sampai dengan 5,02 % dan untuk konsentrasi tinggi yaitu 4,90 sampai dengan 12,39 % (Tabel 2).

Pada hasil uji akurasi inter hari (hari pertama, kedua, ketiga dan keenam), nilai % *diff* untuk konsentrasi rendah yaitu -13,35 sampai dengan 15,00 %, untuk konsentrasi sedang yaitu -7,24 sampai dengan 7,78 % dan untuk konsentrasi tinggi yaitu -7,22 sampai dengan 12,93 %.

Presisi

Uji presisi merupakan tingkat keseksamaan metode yang ditentukan dari nilai koefisien variasi dari konsentrasi terukur. Persyaratannya adalah koefisien variasi $< 20\%$ sampel konsentrasi rendah dan koefisien variasi $< 15\%$ untuk konsentrasi sedang dan tinggi. Pada hasil uji presisi dalam sehari, koefisien variasi untuk konsentrasi rendah 1,83 %, konsentrasi sedang 0,40 % dan konsentrasi tinggi 2,51 % (Tabel 2).

Pada hasil uji presisi inter hari (hari ke-1, ke-2, ke-3 dan ke-6), koefisien variasi untuk konsentrasi rendah 0,35 - 3,70 %, konsentrasi sedang 0,40 - 1,85 % dan konsentrasi tinggi 0,36 - 2,51.

Perolehan kembali

Uji perolehan kembali bertujuan untuk mengetahui pengaruh proses penyiapan sampel (dimulai dari pengambilan sampel, proses ekstraksi sampai dengan dilakukan analisis) terhadap konsentrasi yang terukur. Persyaratan uji perolehan kembali untuk sampel dalam matriks biologi 85 - 115 %. Pada hasil uji ini, nilai perolehan kembali untuk konsentrasi rendah rata-rata 102,18 %, konsentrasi sedang rata-rata 101,28 % dan konsentrasi tinggi rata-rata 103,60 %.

Stabilitas

Uji stabilitas bertujuan untuk menentukan batas waktu yang harus

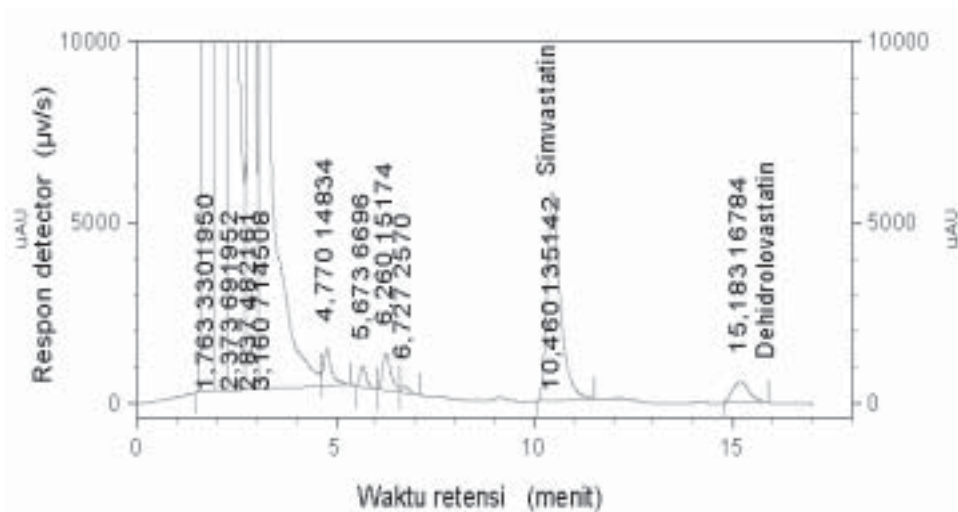
diperhatikan terhadap kestabilan fase gerak, larutan standar maupun sampel, sehingga diharapkan tidak terdapat kesalahan dalam analisis yang sebenarnya disebabkan oleh ketidakstabilan selama belum dilakukan uji. Parameter kestabilan dapat dilihat dari profil kromatogram dan nilai $\% \text{ diff}$.

Hasil uji stabilitas larutan standar menunjukkan kromatogram yang cukup stabil dari hari pertama sampai dengan hari ke-30 dengan nilai $\% \text{ diff}$ yaitu -7,35 sampai dengan -0,10%.

Hasil uji stabilitas beku dan cair menunjukkan kromatogram yang cukup stabil dengan nilai $\% \text{ diff}$ untuk konsentrasi rendah -0,46 sampai dengan 15,00 %, konsentrasi sedang -3,95 sampai dengan 5,02 % dan konsentrasi tinggi -5,31 sampai dengan 12,39 %.

Hasil uji stabilitas jangka pendek pada suhu kamar menunjukkan kromatogram yang cukup stabil dengan nilai $\% \text{ diff}$ untuk konsentrasi rendah -14,69 sampai dengan 10,38 %, konsentrasi sedang -6,37 sampai dengan 7,29 % dan konsentrasi tinggi -3,14 sampai dengan 11,58 %.

Hasil uji stabilitas jangka panjang menunjukkan kromatogram yang cukup stabil sampai hari ke-60 dengan nilai $\% \text{ diff}$ untuk konsentrasi rendah -15,00 sampai dengan 5,47 %, konsentrasi sedang -15,00 sampai dengan 12,65 % dan konsentrasi tinggi -14,82 sampai dengan 12,39 %.



Gambar 2. Kromatogram dehidrolovastatin konsentrasi rendah 0,05 ppm dan standar internal simvastatin 600 ng dalam sampel plasma *in vitro*

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa metode penetapan kadar dehidrolovastatin dalam plasma *in vitro* dengan KCKT memenuhi persyaratan standar sebagai suatu metode yang valid.

DAFTAR PUSTAKA

1. Banjarnahor SDS, *et. al.* 2007. *Hypolipidemic Activity of Lovastatin Derivate Compound in Sprague Dawley Rats*. Research Center for Chemistry Indonesian Institute of Sciences, Serpong, Indonesia.
2. Riley CM and Rosanske TW. 1996. *Development and Validation of Analytical Methods, 1st Edition*. Elsevier Science Ltd, USA: 21-42.
3. Chamberlain J. 1985. *Analysis of Drugs in Biological Fluids*. CRC Press Inc., Boca Raton Florida: 25-31, 95-98.
4. Kelly MT. 1990. *Drug Analysis in Biological Fluids* dalam Chemical Analysis in Complex Matrices. Dublin, Ireland: 17-97.
5. US Departement of Health and Human Services FDA. 2001. *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville MD: 1-23.
6. Rajh SJ, *et. al.* 2003. Comparison of CE and HPLC Methods for Determining Lovastatin and Its Oxidation Products after Exposure to an Oxidative Atmosphere. *Croatica Chemica Acta, CCACAA*. **76(3)** : 263-268.
7. Jacobsen W, *et. al.* 1999. Small Intestinal Metabolism of the 3-

- Hydroxy-3-methylglutaryl Co-enzyme A Reductase Inhibitor Lovastatin and Comparison with Pravastatin. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **291 (1)**: 131-139.
8. Rousseau G, *et. al.* 1999. *A Comparison of the Effects of Lovastatin and Pravastatin on Ubiquinone Tissue Level in Rats*. Faculty of Pharmacy and Departement of Nutrition, Faculty of Medicine, University of Montreal, Quebec, Canada.
 9. Lopez JLC, *et. al.* 2004. Fermentation Optimization for the Production of Lovastatin by *Aspergillus terreus* : Use of Response Surface Methodology. *J. Chem Technol Biotech*. **79**: 1119-1126.